

Bel BioLab

### Протокол 1

#### Рутинная амплификации с использованием Diamant Blitz ДНК полимеразы (с детекцией продуктов амплификации с помощью гель электрофореза).

Все компоненты ПЦР смеси перед использованием должны быть разморожены и хорошо перемешаны.

Мы предлагаем проводить ПЦР в объеме реакционной смеси 25 мкл. Можно также проводить ПЦР в меньших объемах. Для этого уменьшите в соответствующее число раз приводимые ниже количества.

1. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки.

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
<b>2,5-кратный буфер HF*</b>	10	1-кратный
<b>Прямой праймер (50 μM)**</b>	0,2	0,4 μM
<b>Обратный праймер (50 μM)</b>	0,2	0,4 μM
<b>ДНК матрица</b>	Определяется пользователем	1 pg –10 ng плазмидной, фаговой или ВАС ДНК; 0,1-100,0 ng геномной ДНК
<b>Diamant Blitz (2 U/μl)</b>	0,25	0,02 U/μl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Довести реакционную смесь до 25 мкл	

\*-2,5-кратный буфер HF содержит 2 mM MgCl<sub>2</sub> (1-кратная концентрация). В некоторых случаях может потребоваться провести оптимизацию концентраций MgCl<sub>2</sub> в диапазоне 1,5 – 3 mM.

\*\* - Оптимальная концентрация праймеров может находиться в диапазоне 0,2 – 1 μM.

2. Аккуратно смешайте и отцентрифугируйте.

3. Условия проведения ПЦР

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

<b>Начальная денатурация</b>	<b>98°C</b>	<b>30 сек</b>
25-35 циклов	98°C	5-10 секунд
	55°C – 67 °C*	5-15 секунд
	72°C	15-30 секунд на 1 000 п.о.**
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

\* Оптимальная температура отжига может превышать таковую при использовании стандартной Taq полимеразы.

В большинстве случаев температура отжига принимается равной температуре плавления олигонуклеотидов (T<sub>m</sub>) с меньшим ее значением. Благодаря стабилизирующему влиянию sso7d домена на дуплекс праймер/ДНК ПЦР с применением Diamant Blitz ДНК- полимеразы может протекать при температурах на 3-5 °C, превышающих T<sub>m</sub> праймеров.

\*\* Длина амплифицируемого фрагмента может превышать 10 000 п.о. Для несложных матриц (плазмиды, ДНК фагов и ВАС клоны) время элонгации может быть снижено до 15 сек на 1 kbp. Для сложных матриц (геномная ДНК человека) рекомендуемое время элонгации – 30 сек на 1 000 п.о.

4. После окончания амплификации нанесите 3-10 мкл ПЦР смеси в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.

## Протокол 2.

### ПЦР с использованием цельной крови стабилизированной ЭДТА с помощью *Diamant Blitz* ДНК-полимеразы.

В настоящее время способность *Diamant Blitz* ДНК-полимеразы использовать в качестве матрицы цельную кровь тестировалась только на образцах крови, стабилизированных ЭДТА, либо нанесенных на FTA карты.

1. Кровь в количестве 1 мл соберите в одноразовую пластиковую пробирку с раствором антикоагулянта (0,05М раствор ЭДТА в соотношении 500 мкл крови на 50 мкл антикоагулянта).
2. Приготовьте 25 мкл следующей смеси используя 0,2 мл пробирки.

Компонент	Объем (μl)	Конечная концентрация
2,5-кратный буфер F	10	1-кратный
MgCl <sub>2</sub> 50 mM *	0,5	2,5 mM
Прямой праймер (50 μM)**	0,2	0,4 μM
Обратный праймер (50 μM)	0,2	0,4 μM
ЭДТА-стабилизированная кровь**	0,25 - 2,5	1 - 10%
Diamant Blitz (2 U/μl)	0,25 – 0,5	0,02 - 0,04 U/μl
H <sub>2</sub> O	Довести реакционную смесь до 25 мкл	

\*-2,5-кратный буфер HF содержит 2 mM MgCl<sub>2</sub> (1-кратная концентрация). При амплификации с использованием ЭДТА-стабилизированной крови рекомендуется увеличить концентрацию MgCl<sub>2</sub> до 2,5 mM.

\*\* - Оптимальная концентрация крови находится в пределах 1-5% от объема реакционной смеси. Дальнейшее увеличение концентрации крови не приводит к заметному увеличению выхода продукта.

### 3. Условия проведения ПЦР

Мы рекомендуем следующую стандартную схему амплификации:

Начальная денатурация	98°C	5 мин
35-40 циклов	98°C	10 секунд
	55°C – 67 °C	15 секунд
	72°C	30 секунд ( при длине ампликона до 1000 п.о.)
Финальная элонгация	72°C	5 минут
Хранение	4°C	∞

4. После окончания амплификации отцентрифугируйте пробирки (в случае если осадок крови был ресуспендирован) 5 мин при  $\geq 1\,000$  g. Супернатант (5-10 мкл) нанесите в лунку геля с необходимым процентом агарозы для анализа ампликона.
5. В случае проведения рестрикционного анализа отберите 10 мкл супернатанта и внесите туда 0,5 – 10 ед. необходимой рестрикционной эндонуклеазы. Инкубируйте 1 ч. при температуре, указанной производителем фермента. После этого нанесите смесь на агарозный гель-электрофорез. Если рестрикционная эндонуклеаза не работает в ПЦР буфере, можно развести пробу в 2-3 раза дистиллированной водой.

## Примеры применения

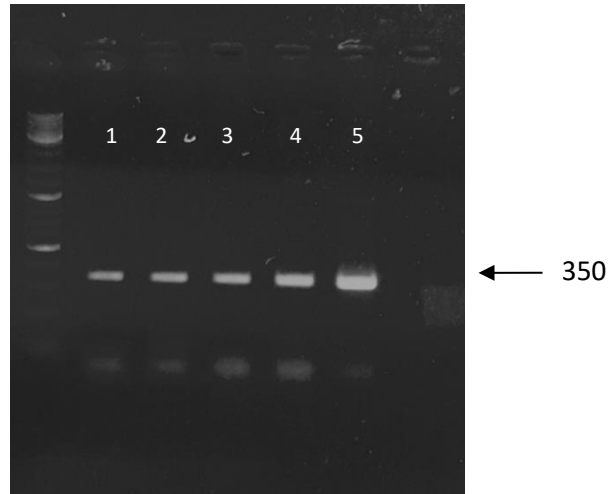
### 1. Амплификация участка гена альбумина человека с использованием ЭДТА-стабилизированной крови.

В ПЦР применяли следующие олигонуклеотиды: AlbuminF gccctctgctaacaagtcctac и Albumin R gcscataaaaagaaatcgccaatc.

#### Протокол

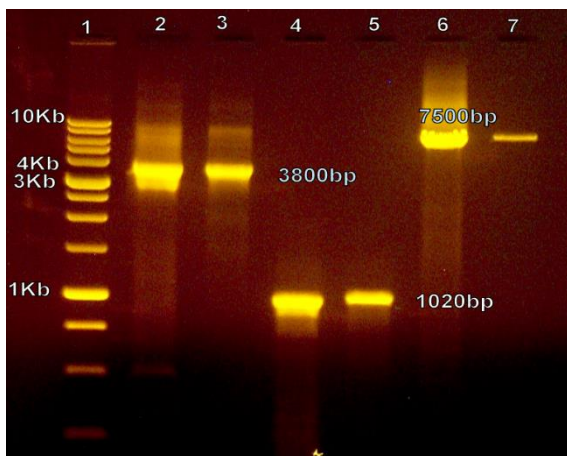
98 – 5 мин      1 цикл

$\left\{ \begin{array}{l} 98-10 \text{ сек} \\ 60-15 \text{ сек} \\ 67-30 \text{ сек} \end{array} \right\} 40 \text{ циклов}$



- 1–проба с 1% ЭДТА-стабилизированной крови;
- 2–проба с 2,5% ЭДТА-стабилизированной крови;
- 3–проба с 5% ЭДТА-стабилизированной крови;
- 4–проба с 10% ЭДТА-стабилизированной крови;
- 5–проба с очищенной ДНК человека ( $10^3$  геном/эквивалентов на реакцию);

### 2. Амплификация 1020, 3 800 и 7 500 п.о. фрагментов с использованием очищенной ДНК человека и ДНК из высушенной на FTA-картах крови.



1–1Kb DNA Ladder;

2–3800 bp ампликон (ген b-globin, матрица – очищенная ДНК человека 50 нг, время амплификации – 1 ч, 30 мин);

3–3800 bp ампликон (ген b-globin, матрица -1mm<sup>2</sup> участок фильтровальной бумаги с высушенной кровью, амплификация без выделения ДНК, время амплификации – 1 ч, 30 мин);

4–1020 bp ампликон (human glutathione peroxidase 3 gene матрица – очищенная ДНК человека 50 нг, время амплификации – 38 мин);

5–1020 bp ампликон (human glutathione peroxidase 3 gene, матрица -1mm<sup>2</sup> участок фильтровальной бумаги с высушенной кровью, амплификация без выделения ДНК,

время амплификации – 38 мин);

6–7500 bp ампликон ( human b-globin gene, матрица – очищенная ДНК человека 50 нг, время амплификации – 2 ч, 50 мин)

7-7500 bp ампликон ( human b-globin gene, матрица -1mm<sup>2</sup> участок фильтровальной бумаги с высушенной кровью, амплификация без выделения ДНК, время амплификации – 2 ч 50 мин мин)

#### Протокол:

Во всех случаях использовали протокол с 2-мя циклами.

98 – 5 мин	1 цикл
$\left\{ \begin{array}{l} 98-10 \text{ сек} \\ 72 – 15-30 \text{ сек}^* \end{array} \right\}$	35 циклов
	.

\*Отжиг/элонгация для ампликона 1 020 п.о.– 15 сек;

\* Отжиг/элонгация для ампликонов 3800 и 7500 п.о. – 30 сек/1000 п.о.